

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **11332567 A**(43) Date of publication of application: **07 . 12 . 99**

(51) Int. Cl

C12N 15/09
A61K 38/00
A61K 39/395
C12P 21/08
C12Q 1/68
G01N 33/53

(21) Application number: **10140703**(22) Date of filing: **22 . 05 . 98**(71) Applicant: **DAI ICHI SEIYAKU CO LTD**(72) Inventor: **IZUHARA KENJI
HAMAZAKI NAOTAKA****(54) JUDGMENT OF ATOPIC PREDISPOSITION****(57) Abstract:**

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for correctly judging risk of atopic allergosis from a specific gene sequence of an individual by using the technique of genetic engineering.

SOLUTION: This method comprises the judgment of atopic predisposition wherein an individual having

the α -chain of interleukin 4 receptor having isoleucine at 50th. site from its N-terminal is judged to be at risk of atopic allergosis by e.g. a process for amplifying, through PCR technique, the nucleic acid partial base sequence or a fragment having the whole length of the gene encoding the α -chain of interleukin 4 receptor.

COPYRIGHT: (C)1999,JPO

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平11-332567

(43)公開日 平成11年(1999)12月7日

(51)Int.Cl.⁶
C 12 N 15/09
A 61 K 38/00
39/395
C 12 P 21/08
C 12 Q 1/68

識別記号
ZNA
ABF

F I
C 12 N 15/00
A 61 K 39/395
C 12 P 21/08
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53

ZNAA
ABFN
Z
Q

審査請求 未請求 請求項の数21 OL (全 11 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平10-140703

(22)出願日 平成10年(1998)5月22日

(71)出願人 000002831
第一製薬株式会社
東京都中央区日本橋3丁目14番10号

(72)発明者 出原 賢治
福岡県福岡市南区長住4-9-4

(72)発明者 濱崎 直孝
福岡県福岡市城南区東油山1-23-3

(74)代理人 弁理士 今村 正純 (外1名)

(54)【発明の名称】 アトビ一体質の判定方法

(57)【要約】

【課題】 遺伝子工学の手法を用いて、個体の特定の遺伝子配列からアトピー性アレルギー疾患の発症危険性を正確に判定する方法を提供する。

【解決手段】 アトビ一体質を判定する方法であって、インターロイキン4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程などにより、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 α 鎖を有する個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する方法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 アトピー体質を判定する方法であって、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 α 鎖を有する個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する方法。

【請求項 2】 インターロイキン4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定することにより判定を行う請求項1記載の方法。

【請求項 3】 インターロイキン4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程を含む請求項1記載の方法。

【請求項 4】 インターロイキン4受容体 α 鎖をコードする遺伝子においてインターロイキン4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する請求項2又は3記載の方法。

【請求項 5】 インターロイキン4受容体遺伝子の両方の対立遺伝子においてインターロイキン4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定する請求項4記載の方法。

【請求項 6】 アトピー性アレルギー疾患の発症危険性を判定する方法であって、下記の工程：

(a) 個体より分離した生体試料を用いてインターロイキン4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程；

(b) 11e50Va1変異を含むフラグメントが得られた場合には、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する工程、を含む方法。

【請求項 7】 下記のプライマー・セット：

Aプライマー：5' - CGGAATTCCGAGGCC
CACACGTTGT

Bプライマー：5' - CGCTGGGCTTGAAGG
AGを用いる請求項3ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 8】 アトピー性アレルギー疾患の発症危険性を判定するために用いるプライマー・セットであって、請求項7に記載のAプライマー及びBプライマーを含むセット。

【請求項 9】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 α 鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて判定を行う請求項1記載の方法。

【請求項 10】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 α 鎖を含むインターロイキン受容体にアンタゴニストとして結合するリ

ガンドを含むアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤。

【請求項 11】 インターロイキン受容体がインターロイキン4受容体である請求項10記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項 12】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 α 鎖を含むインターロイキン受容体にアンタゴニストとして結合するリガンドを評価する工程を含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤の評価方法。

【請求項 13】 インターロイキン受容体がインターロイキン4受容体である請求項12記載の治療及び／又は予防剤の評価方法。

【請求項 14】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体 α 鎖を含むインターロイキン受容体を不活性化する物質を有効成分として含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤。

【請求項 15】 インターロイキン受容体がインターロイキン4受容体である請求項14記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項 16】 インターロイキン受容体を不活性化又は阻害する物質が、モノクローナル抗体又はそのモノクローナル抗体の抗原認識部位を有する物質である、請求項14又は15記載の治療及び／又は予防剤。

【請求項 17】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の α 鎖を含むインターロイキン受容体から引き起こされるIgEの生産増加の阻害剤又は抑制剤。

【請求項 18】 N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の α 鎖を含むインターロイキン受容体から引き起こされるstatt6のリン酸化の阻害剤又は抑制剤。

【請求項 19】 アトピー性アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎、アトピー性喘息又は花粉症である請求項1ないし6のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 20】 アトピー性アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎、アトピー性喘息又は花粉症である請求項10、請求項11、請求項14ないし16のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 21】 アトピー性アレルギー疾患がアトピー性皮膚炎、アトピー性喘息又は花粉症である請求項12又は13記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】本発明は、アトピー性アレルギー疾患の発症の危険性を判定する方法に関する。より具体的には、個体の特定の遺伝子配列から遺伝子工学の手法を用いてアトピー性アレルギー疾患の発症危険性を正確に判定する方法に関するものである。

【0002】喘息は日常生活に支障をもたらす疾病であ

り、小児や若年成人におけるその主因はアトピーである。アトピーにはヘルパーT細胞タイプ2サブタイプが関与しており、特にインターロイキン(IL-4)が過剰でダニや花粉などの環境に存在する抗原に対するIgEが產生されている免疫不全である(Shirakawa, T. et al., Science, 275, pp. 77-79, 1997)。気道の肥満細胞に結合したIgEと抗原との反応は粘膜の炎症を誘起し、これが喘息症状を引き起す。アトピーの発症に遺伝的要因が関与する可能性は、臨床の場において経験的に認められている。しかしながら、アトピーは遺伝的要因に環境的要因が加わって発症する多因子遺伝疾患であるため、その原因遺伝子の同定は非常に困難であった。

【0003】遺伝学的なアプローチである染色体を対象とした連鎖解析により、血清IgE値と第5、6、7、11、および16染色体との関連が示されている。これらの染色体には、IL-4などの種々のサイトカイン、HLA、T細胞受容体、高親和性IgE受容体、およびIL-4受容体など多様な遺伝子が存在しており、これらの遺伝子がアレルギー、特にアトピー関連遺伝子の候補として考えられている。広範な一連の研究の結果、遺伝学的には2種以上の遺伝子がアトピーに関与していることが判明したが(Daniels, S.E., et al., Nature, 383, pp. 247-250, 1996; NatureGenet., 15, pp. 389-392, 1997)、これらの遺伝子がどのような機構でアトピーの遺伝的体質に関与するのかなどの機能面での証明は皆無であり、あくまで原因遺伝子としての候補の域を脱していなかった。

【0004】IL-4やインターロイキン13(IL-13)は、B細胞におけるIgE産生やヘルパーT細胞のTh2サブタイプへの分化に必須のサイトカインであり、IgE依存性であるアレルギー疾患の病態進展に深く関連している。特に、IL-4は多機能造血性サイトカインであり、B細胞がIgE抗体を産生するのに必須であると共に、ヘルパーT細胞がTh2(ヘルパーT細胞サブタイプ2)へと成熟化するのにも不可欠であるところから(Zurowski, G. et al., Immunology Today, 15, pp. 19-26, 1994)、IgE-依存性アトピー障害において決定的な役割を果たしていると考えられる。

【0005】IL-4やIL-13がIgE産生やヘルパーT細胞のTh2サブタイプへの分化誘導を惹起するには、Signal Transducer and Transcription factor-6 (STAT 6; 以下、「statt 6」と略す場合がある)と呼ばれる転写因子が細胞内情報伝達系において重要な役割を果たしている。IL-4は、IL-4受容体 α 鎖とインターロイキン2受容体 γ 鎖(共通 γ 鎖: Russel, S.M. et al., Science, 262, pp. 1880-1882, 1993)とからなる特異的な受容体複合体を介して作用する。IL-4受容体 α 鎖にはヤヌスカイネース(Janus kinase)であるJAK1が会合し、共通 γ 鎖にはJAK3が会合して、これらのチロシンリリン酸化酵素がstatt 6を活性化する。

【0006】最近、IL-4受容体 α 鎖のバリエントで

あるArg576Gln(アミノ酸番号は1番目のATGコドンからの番号を示し、数字の右側に示した天然型アミノ酸が数字左側に示したアミノ酸に変異したこと)が他のアトピー関連障害[過IgE症候群及び重症湿疹]と関連付けられて、負の調節分子であるSHP-1が受容体に結合するのを妨げることが示された(Khurana, G.K., et al., New Engl J. M., 337, pp. 1720-1725, 1997)。

【0007】一方、ヒトIL-4受容体 α 鎖のIle50Val変異も同定されている(50は2番目のATGコドンからの番号である)(Idzerda, R.L., J. Exp. Med., 171, pp. 861-873, 1990; Garizzi, J.-P. et al., Int. Immunol., 2, pp. 669-675, 1990)。これは、ヒトIL-4受容体 α の細胞外変異で今日までに知られている唯一のものである(Deichmann, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm., 231, pp. 696-697, 1997)。しかしながら、このヒトIL-4受容体 α 鎖のアミノ酸変異とアトピーとの関連については従来報告がない。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、アトピー性アレルギー疾患の発症の危険性を正確に判定する方法を提供することにある。より具体的には、遺伝子工学の手法を用いて、個体の特定の遺伝子配列からアトピー性アレルギー疾患の発症危険性を正確に判定する方法を提供することが本発明の課題である。

【0009】

【課題を解決するための手段】本発明者らはヒトIL-4受容体 α 鎖の遺伝子変異とアトピー性アレルギー疾患発症との相関を解明すべく、アトピー性及び非アトピー性の喘息について大規模な遺伝子連鎖解析を行い、見出された変異型IL-4受容体 α 鎖遺伝子をマウス及びヒトのB細胞系にトランسفェクションを行った後、機能検定を行った。その結果、IL-4受容体 α 鎖のIle50Val変異が喘息の発症に強く関与していることを見出した。本発明は上記の知見を元にして完成されたものである。

【0010】すなわち本発明は、アトピー性アレルギー疾患発症の危険性を判定する方法であって、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を有するヒト個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する方法を提供するものである。この発明の好ましい態様によれば、IL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定することにより判定を行う上記方法；及び、IL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程を含む上記方法が提供される。

【0011】別の好ましい態様によれば、IL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子においてIL-4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列が

イソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する上記方法；インターロイキン4受容体遺伝子の両方の対立遺伝子のうち少なくとも一方の遺伝子においてIL-4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定する上記方法；及び、インターロイキン4受容体遺伝子の両方の対立遺伝子においてIL-4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、その個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定する上記方法が提供される。

【0012】別の観点からは、アトピー性アレルギー疾患発症の危険性を判定する方法であって、下記の工程：(a) ヒト個体より分離した生体試料を用いてIL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程；及び(b) IL-50Va1変異を含むフラグメントが得られた場合にはその個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する工程を含む方法；下記のプライマー・セット：Aプライマー：5'-CGGAATTCCGAGGCCACACGTTGT、及びBプライマー：5'-CGCTGGGCTTGAAGGAGを用いる上記方法；及びN末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて判定を行う上記方法が提供される。

【0013】さらに別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を含むインターロイキン受容体（好ましくはIL-4受容体又はIL-13受容体、より好ましくはIL-4受容体）にアンタゴニストとして結合するリガンドを含むアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤；N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を含むインターロイキン受容体（好ましくはIL-4受容体又はIL-13受容体、より好ましくはIL-4受容体）にアンタゴニストとして結合するリガンドを評価する工程を含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤の評価方法が提供される。

【0014】また、別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を含むインターロイキン受容体（好ましくはIL-4受容体又はIL-13受容体、より好ましくはIL-4受容体）を不活性化又は阻害する物質、好ましくはモノクローナル抗体を有効成分として含む、アトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤が提供される。

【0015】さらに、別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の α 鎖を有するインターロイキン受容体から引き

起こされるIgEの生産増加の阻害剤又は抑制剤；N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるインターロイキン4受容体の α 鎖を有するインターロイキン受容体から引き起こされるstatt 6のリン酸化の阻害剤又は抑制剤が提供される。これらの発明において、アトピー性アレルギー疾患の好ましい例としては、アトピー性皮膚炎、アトピー性喘息、又は花粉症を挙げることができる。

【0016】

【発明の実施の形態】本発明の方法は、アトピー性アレルギー疾患発症の危険性を判定するにあたり、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を有する個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定することを特徴としている。ヒトIL-4受容体 α 鎖のアミノ酸配列及びIL-50Va1変異については公知文献に記載されている(Idzerda, R. L., J. Exp. Med., 171, pp. 861-873, 1990; Garizzi, J.-P. et al., Int. Immunol., 2, pp. 669-675, 1990)。

【0017】本発明の方法では、判定を行うにあたり、個体から分離・採取された生体試料を用いて、その個体が有するIL-4受容体のIL-4受容体 α 鎖にIL-50Va1変異が含まれるか否かを確認する。この確認のための手段は特に限定されず、IL-4受容体 α 鎖を構成するポリペプチド鎖のアミノ酸配列を直接分析する方法のほか、遺伝子工学的な手法に従って、インターロイキン4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定する方法などを採用することができる。生体試料の種類は特に限定されないが、例えば、血液、組織片などを用いることが好ましい。

【0018】IL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸配列を決定する方法としては、PCR（ポリメラーゼ・チェーン・リアクション）法を採用することが好ましい。この方法は遺伝子工学の分野で周知かつ汎用されており、適宜のプライマー配列を用いることにより、目的の遺伝子フラグメントを短時間に簡便に増幅することができる。PCR法により、IL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の部分塩基配列であって、該遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列（IL-4受容体 α 鎖のN末端アミノ酸をコードする核酸を核酸番号1から3とする）、又はIL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の全長を含むフラグメントを増幅することができる。

【0019】PCR法の反応条件、試薬などは当業者に適宜選択可能であり、プライマー配列も所望のフラグメントを効率的に増幅できるように適宜設計して用いることができる。例えば、下記のプライマー・セット：Aプライマー：5'-CGGAATTCCGAGGCCACACGTTGT、及びBプライマー：5'-CGCTGGGCTTGAAGGAGを用いると、効率的に所望の

フラグメントを調整することが可能である。増幅されたフラグメントの核酸配列を決定する方法も特に限定されず、当業者に利用可能な種々の方法のうちいかなるものを探用してもよい。

【0020】本発明の判定方法に従えば、IL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子においてIL-4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合に、そのヒト個体、好ましくはヒト小児個体はアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定される。このような個体には、I1e50ホモ及びヘテロが含まれる。これらのうち、少なくとも一方の対立遺伝子においてIL-4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合(I1e50ヘテロ)には、その個体はI1e50を含まない個体に比べてアトピー性アレルギー疾患の発症危険性が高いと判定できる。また、両方の対立遺伝子においてIL-4受容体 α 鎖のN末端から50番目のアミノ酸をコードする核酸配列がイソロイシンをコードする核酸配列である場合(I1e50ホモ)には、その個体はI1e50ヘテロの個体よりもアトピー性アレルギー疾患の発症危険性がさらに高いと判定される。

【0021】本発明の方法は、一般的には、下記の2工程:(a)ヒト個体より分離した生体試料を用いてIL-4受容体 α 鎖をコードする遺伝子の核酸番号150から152を含む部分塩基配列又は全長を含むフラグメントをPCR法により増幅する工程；及び(b) I1e50Va1変異を含むフラグメントが得られた場合にはその個体をアトピー性アレルギー疾患の発症危険性ありと判定する工程を含む方法により実施されることが好ましい。

【0022】別の観点からは、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を含むIL-4受容体又はIL-13受容体にアンタゴニストとして結合するリガンドを有効成分として含むアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤が提供される。ある物質がアンタゴニストとしてIL-4受容体 α 鎖を含むIL-4受容体に結合可能か否かは、結合定数(受容体親和性)やインターロイキン4の生理活性発現阻害*

*濃度などを調べることにより容易に判定できる。本発明のアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤の評価方法は、種々の化合物のなかから、上記の特徴を有するリガンドを評価により選択することを特徴としている。候補物質を選別するための指標としては、例えば、上記に説明した結合定数やIL-4阻害濃度などを用いることができる。

【0023】また、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を含むIL-4受容体を不活化する物質、例えば、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を特異的に認識するモノクローナル抗体を有効成分として含む医薬もアトピー性アレルギー疾患の治療及び／又は予防剤として有用である。モノクローナル抗体の製造方法は当業者に周知かつ慣用であり、N末端から50番目のアミノ酸がイソロイシンであるIL-4受容体 α 鎖を抗原として用いることにより、上記の特徴を有するモノクローナル抗体を製造することができる。なお、IL-4受容体 α 鎖のI1e50Va1変異を特異的に認識できるモノクローナル抗体は、本発明の判定方法にも好適に用いることができる。

【0024】

【実施例】以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は下記の実施例に限定されることはない。

例1

母集団の推計学的解析において、I1e50Va1変異の試験は、PCRに基づいたMs11制限アッセイを用いて行った。コントロール被験者におけるIL-4受容体 α I1e50及びVa150に対するゲノタイプ頻度はハーディー-ワインバーグ平衡と合致しており、p(I1e50)=0.4、q(Va150)=0.6であった。コントロール群とアトピー患者群の間でI1e50及びVa150のゲノタイプ頻度は顕著に異っていた(表1)。

【0025】

【表1】

フェノタイプ	Ile50/Ile50	Ile50/Val50	Val50/val50
コントロール	18	46	36
喘息患者			
アトピー成人	59	27	14
アトピー小児	60	28	14
非アトピー成人	16	50	34
低総 IgE(<400 U/ml)	35	87	68
高総 IgE(>400 U/ml)	119	65	34
ダニ抗原陰性	34	92	64
ダニ抗原陽性	119	59	32

【0026】Ile50はアトピー性喘息に関連しているが、内因性喘息や非アトピー性喘息には関連がなかった。Ile50は、総血清IgEレベルの上昇（予測比=3.94、95%CI 1.90-5.88、 $p < 0.01$ ）とダニ特異性IgEの上昇（予測比=3.18、95%CI 1.72-2.28、 $p < 0.01$ ）にも関連していた。アトピー性喘息との関連は、特に小児において強かった（予測比=6.30、95%CI 3.66-8.95、 $p < 0.001$ ）；成人（予測比=3.67、95%CI 1.57-6.69、 $p < 0.01$ ）。これらの結果は、若年の一卵性双生児が喘息症状と総血清IgEレベルとの間に最も高い対応率を示したことと一致しており、かつアトピーや喘息に対する相対的な遺伝的インプットまたは遺伝性が小児において最大であるという結論とも一致する（Shirakawa, T., et al., J. Clin. Epidemiol., 49, pp. 1059-1065, 1996）。

【0027】小児喘息群におけるIle50ホモ接合体の高い頻度[~60%]は、アトピーに関するIle50の主として劣性の遺伝的効果を示唆しており、一方、Arg576Glnの効果は主として優性であるように見受けられた（Khurana, G.K., New Engl. J.M., 337, p. 1720-1725, 1997）。この結果は、異質性が一つの座の中だけでなく異なる座の間でも見られるというアトピーの遺伝学的複雑さを示している。

【0028】IL-4受容体αのIle50変異とVal150変異の機能を調べるために、これらの変異を示すcDNAを用いて、ルシフェラーゼまたはヒト成長ホルモン遺伝子のいずれかに結合させたヒトI ϵ 遺伝子のプロモーター領域を含むプラスミドを構築し、マウスBリンパ球又はヒトBリンパ球にトランスフェクトした。このI ϵ -ルシフェラーゼ構築物をマウスのprō-B細胞系であるBa/F3[BF-GETP]にトランスフェクトし、I ϵ -ヒト成長ホルモン構築物をヒトB細胞系であるJijoye[J-GETP]にトランスフェクトした。次いで、これらの系のクローニングに発現ベクタ

20

30

40

50

ー(Ile50またはVal150 IL-4受容体α cDNA(図1(b))のいずれかを担持)をトランスフェクトした。

【0029】マウスBF-GETP系をスクリーニングに付すと、10種のIle50の内4種、10種のVal150のうち2種のトランスフェクトされたクローニングヒトIL-4の刺激を受けて良好生育した。Ile50 BF-GETPは、ヒトIL-4の刺激を受けて生育したVal150 BF-GETPに比べてほぼ3倍量の生育を示した（図2）。それらのルシフェラーゼ活性は、マウスIL-4の刺激に対しては互いに異ならず、また親BF-GETPクローニングとも異ならなかつたが、これは、ジャームラインイプシロン転写物の転写に対する細胞内機構がIle50BF-GETP及びVal150BF-GETPの両者において正常であることを示している。Ile50BF-GETPは、Val150クローニングと比較した場合、ヒトIL-4に呼応したI ϵ 転写物の誘導が約3倍大きかった（それぞれ5.4倍増および15.5倍増）（図3）。

【0030】Val150トランスフェクト物よりもIle50の発現が高いためにヒトIL-4の刺激に対してIle50BF-GETPの応答が増強されている可能性を評価するために、結合アッセイを行つた。その結果、平均Kd {52 (39-63) pM}对56 (40, 71) pM-図4}におけるIle50BF-GETPとVal150BF-GETPの間には差異がなかつた。細胞上のIle50IL-4受容体αの平均数(2300部位/細胞)はVal150IL-4受容体αの平均数(2300部位/細胞)と同じであった。この結果は、Ile50がヒトIL-4受容体αの機能をアップレギュレートし、その結果としてヒトIL-4に呼応した細胞増殖の増加とジャームラインイプシロン転写物(I ϵ により支配されている領域のこと)の増加の両方をもたらすことを強く示唆している。

【0031】トランスフェクトされたヒトJ-GETPクローニングにおいても同じ結果が得られた。スクリーニン

グの際、10個の薬剤耐性クローニングを得たが、これらはそれぞれIL-1_e50IL-4受容体 α またはV_a150IL-4受容体 α を有していた。これらのなかから応答性の高いクローニングを3個選んで以下の試験に使用した。

IL-1_e50-J-GETPは、IL-4に応答してV_a150-J-GETPが産生したよりも約3倍多い成長ホルモンを産生した(図5)。平均Kd{63-143対100-143pM}については、IL-1_e50J-GETPとV_a150J-GETPの間には差異がなく

(図6)、またJ-GETP上のIL-4受容体 α の数においても差はなかった{IL-1_e50では1000-10000/細胞に対しV_a150では3600-4200/細胞}。

【0032】Stat6欠損マウスではIgEが産生されないことから(Takeda, K. et al., Nature, 380, pp. 627-630, 1996; Shimoda, K., et al., Nature, 380, p. 630-633, 1996)、上記の知見を明確にし、さらに発展させるために、転写因子Stat6の相対的活性化を検討した。IL-1_e50及びV_a150J-GETPにおけるStat6の活性化の動的パターンはほぼ同等であったが、マウスBF-GETP及びヒトJ-GETPクローニングの両者において、V_a150と比較してIL-1_e50変異体はStat6の活性化を約2倍増強していた(図7:細胞は各ヒトIL-4濃度で15分間インキュベートした)。

【0033】マウスとヒトの両細胞系から得られたデータは、IL-4受容体 α のIL-1_e50がIL-4に対する受容体の応答を顕著に増加させ、その結果、Stat6の活性を増加させて、増殖とジャームライン ϵ 産生をもたらすという結論を強く示唆している。これらの知見は、IL-1_e50とIgEの高い血清レベルとの間に見いだした強い関連性(両方ともトータル且つアレルゲン特異性)と完全に一致しており、また統計解析におけるアトピー性喘息とも完全に一致している。なお、IL-4受容体 α はIL-4受容体及びIL-13受容体の両者に共通の成分であるところから(Callard, R.E., Immuno. Today, 17, pp. 108-110, 1996)、IL-13はIL-4の多様な機能の一部を共有している。従って、IL-4受容体 α 鎖の変異は、IL-13の機能を増強する可能性がある。

【0034】[実験方法]

被験者の選定

医学検査会社における患者の中からコントロールとして120名の被験者を選定した。選定した被験者の性別と年齢による罹病率はこの地域でのものに合致させた。医師によってアレルギー、内因性小児アレルギー性喘息と診断された120症例を2病院からそれぞれ集めた。被験者は以下の呼吸器症状のうちの2以上を呈した場合に喘息と判定した。(i)咳、(ii)痰、(iii)呼吸困難、(iv)一日中あるいは夜間のぜい鳴、または

(v)2年以上にわたるぜい鳴を伴った欠乏呼吸の发作。成人被験者にはヘビースモーカー(紙巻きタバコ20本超/日)はいなかった。

【0035】血清学的試験

MAST(日立製作所)を用いて特異的IgEを検出し、文献記載の方法と同様にして陽性タイターに対するカットオフ値を用いた(Mao, X.-Q. et al., Lancet, 348, pp. 581-583, 1996)。文献記載の小児に対する正常値より大きいかあるいは成人では400kU/L(平均+/-2SD)より大きいものを、高い総IgE値(CAP, Uppsala, スウェーデン)とした。アトピーはIgE応答性で定義し、総血清IgEの高濃度値として、あるいは15種の高度に精製した空膜アレルゲンの一種以上に対する陽性特異性IgEタイターか、これら2つの組合せで診断を下した。

【0036】DNA法

DNAサンプルは市販キット(IsoQuick, Microprobe Corporation、米国ガーデングローブ)を用いて抽出した。ヒトIL-4受容体 α に対してはゲノミックDNAではなくcDNA配列のみしか入手できなかったため、マウスIL-4受容体 α 遺伝子のエクソン-インtron構造に基づいて次のプライマーを用いた(Wrighton, N. et al., Growth Factor, 6, pp. 103-118, 1992)。最初94℃で5分間変性させた後、100ngのゲノミックDNAをテンプレートとして全30μlの反応液中でPCR反応を行い、94℃で30秒、60℃で30秒、さらに72℃で30秒のサイクルを37サイクル実施した。プライマーとして、5'-CGGAATTCCGAGGCCACACGTTG T及び5'-CGCTGGGCTTGAAGGAGを用いた。アンダーラインを付した配列は、PCR産物の延長のために加えた。2ユニットのMs11(New England Biolab、英国)で一夜消化した後、5%アガロースグルでDNAを分離した(2:3Nusieve GTG:アガロース)。

【0037】機能アッセイ

文献記載の方法に従って部位特異的突然変異誘発を実施した(Kunkel, T.A., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82, pp. 488-492, 1985)。5'CTCAGGGATAC ACCCGで表されるオリゴヌクレオチドを突然変異誘発に用いた。パリンまたはイソロイシンを担持するヒトIL-4受容体 α のプラスミドDNAをpcDNA3.1/Zeoベクター(Invitrogen、カナダ国カールスバッド)に挿入し、これらをそれぞれV_a150及びIL-1_e50と命名した。

【0038】トランスクレクトB細胞系の構築

pGL3エンハンサーベクター(プロメガ社、ウィスconsin州マジソン)に挿入したヒトIL-4の-187~+6のプロモーター領域を含むプラスミドとpSV2ネオマイシン耐性遺伝子とをマウスpro-B細胞系である

Ba/F3に共トランسفェクトし、得られた形質転換細胞をBF-GETPと命名した。Va150IL-4受容体 α またはIle50IL-4受容体 α のいずれかを電気穿孔法によってBF-GETPにトランسفェクトした。

【0039】ヒト成長ホルモンcDNA及びヒトIL-583~3のプロモーター領域を挿入したpS72ベクターのプラスミドでヒトバーキットリンパ腫瘍細胞系であるJijoyeをトランسفェクトした。この形質転換細胞はJane E. DeVries博士(DNAリサーチ・インスチチュート、カリフォルニア州パロアルト)から寄贈されたものであり、J-GETPと称する。Va150またはIle50IL-4受容体 α のいずれかを電気穿孔法によってJ-GETPにトランسفェクトした。

【0040】BT-GETPを用いたMTTアッセイ
各種濃度のヒトIL-4で24時間インキュベートした細胞の増殖応答を従前記載のMTT法によって検定した(Yokota, T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, pp. 1070-1074, 1984)。

BT-GETPを用いたルシフェラーゼ活性アッセイ
2ng/mlのヒトIL-4またはマウスIL-4の存在下あるいは不存在下で 1×10^6 個の細胞(BT-GETP)を24時間培養後、細胞をリポーター溶解バッファー(プロメガ社)で溶解させ、清澄な細胞溶解液をルシフェラーゼアッセイ試薬(東洋インキ)と混合した。

【0041】成長ホルモンアッセイ

各種濃度のヒトIL-4で 1×10^4 個の細胞を48時間培養後、ELISAアッセイによって成長ホルモンの産生を調べた。

結合アッセイ

125 I-標識ヒトIL-4(NEN、マサチューセッツ州ボストン)の細胞に対する結合アッセイを文献記載の方法に従って行った(Izuhara, K. et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 190, pp. 992-1000, 1993)。

【0042】電気泳動移動度シフトアッセイ(EMSA)

* A)
文献記載の方法に従ってEMSAの操作を実施した(Izuhara, K. et al., J. Biol. Chem., 271, pp. 619-622, 1996)。ヒトIL-4によって刺激された細胞を溶解し、核タンパクを抽出した。用いた核抽出物の量は混合前に標準化した。核抽出物を結合バッファーであるp01y(dL-dC)及びI ϵ の 32 P標識オリゴヌクレオチドプローブ(5' GTCAACTTCCCAAGAACAGAA)と混合した後、混合物をポリアクリルアミドゲルで電気泳動により分離した。DNA-タンパク複合体をオートラジオグラフィーで視覚化した。

【図面の簡単な説明】

【図1】 インターロイキン4受容体 α 鎖の構造を示す図である。図中、(a)ヒトIL-4受容体 α 鎖の構造の模式図であり、斜線部分はシグナルペプチド、黒く塗った部分はトランスマンプレンドメインを示す。(b)はIle50またはVa150をコードするcDNA配列を示す。

【図2】 Ba/F3トランسفェクタントアッセイ(MTTアッセイ)の結果を示す図である。

【図3】 Ba/F3トランسفェクタントアッセイ(ルシフェラーゼ活性アッセイ)の結果を示す図である。図中、ヒトIL-4の刺激が無い場合の各クローンのルシフェラーゼ活性を1倍として結果を示した。

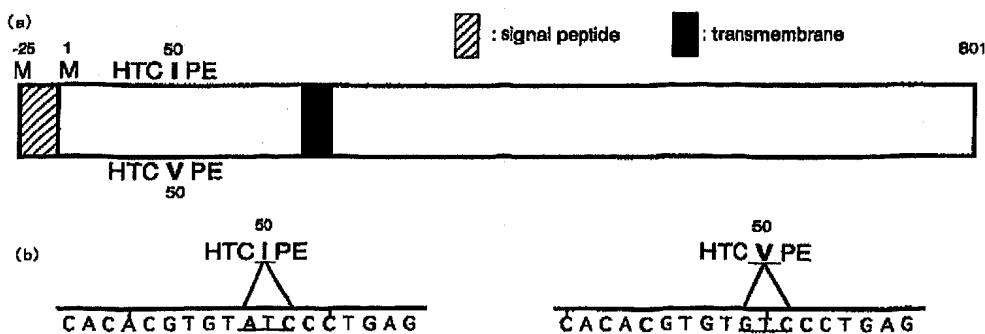
【図4】 Ba/F3トランسفェクタントアッセイ(結合アッセイ)の結果を示す図である。

【図5】 Jijoyeトランسفェクタントアッセイ(成長ホルモン活性アッセイ)の結果を示す図である。誤差を示す縦棒はそれぞれ3クローンでの偏差を示す。

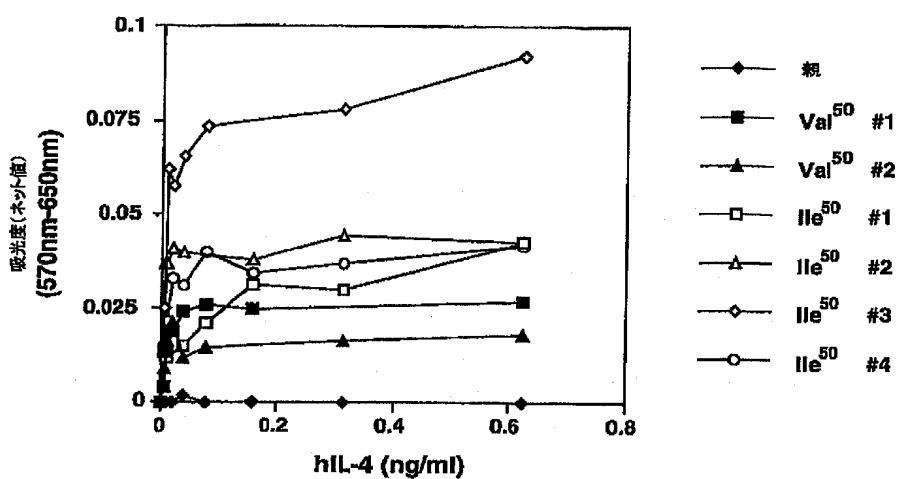
【図6】 Jijoyeトランسفェクタントアッセイ(結合アッセイ)の結果を示す図である。

【図7】 IL-4受容体及びBF-GETP又はJ-GETPによって誘発されたStat6活性を示した図である。図中、矢印はStat6含有DNA複合体の位置を示す。また、図中、AはBF-GETPの結果を示し、BはJ-GETPの結果を示す。

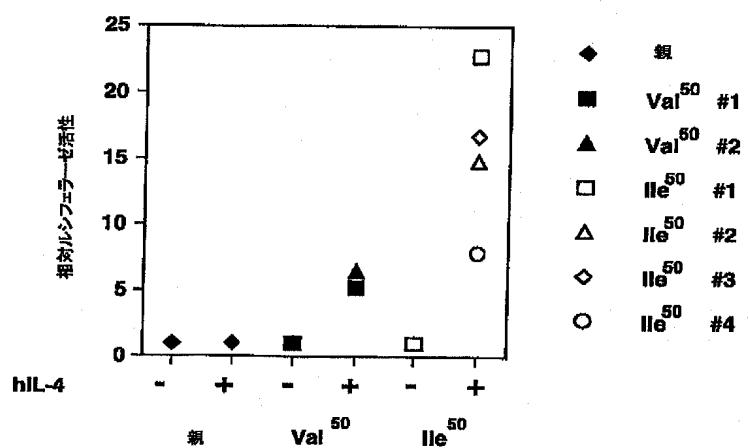
【図1】



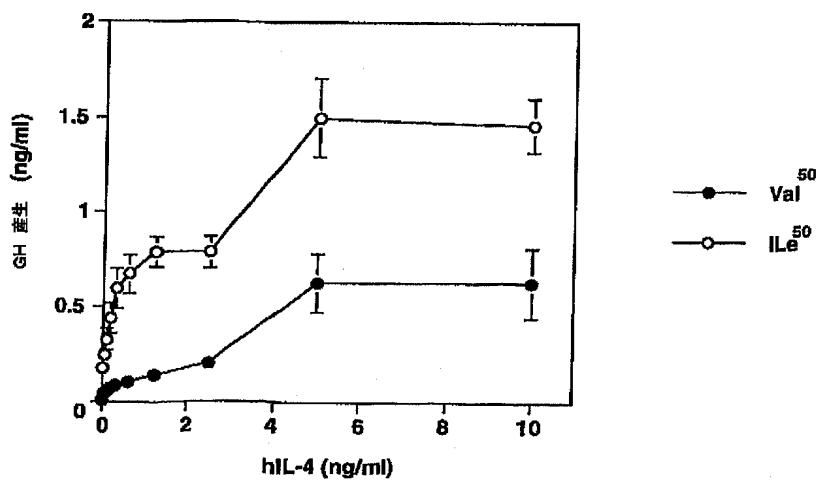
【図2】



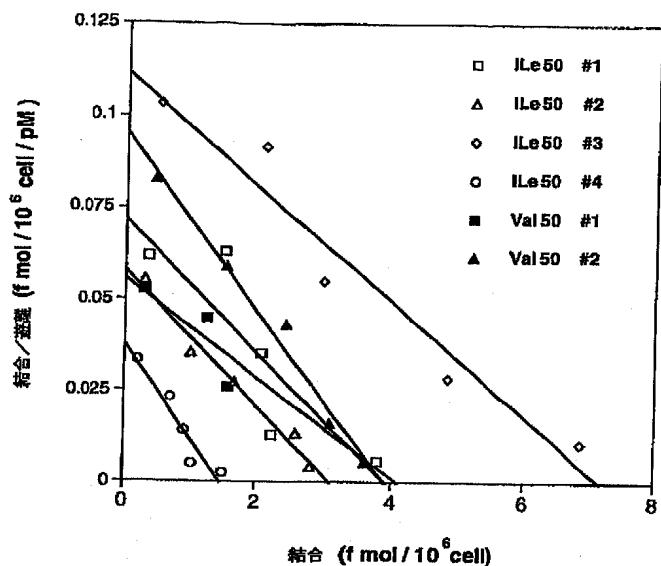
【図3】



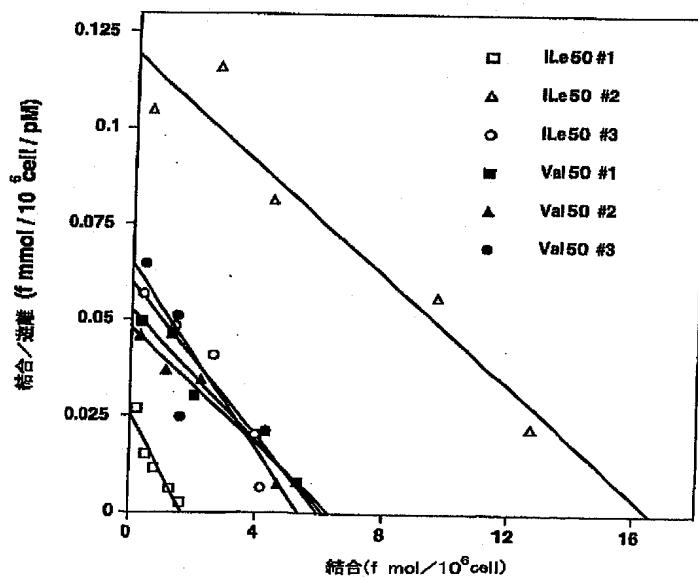
【図5】



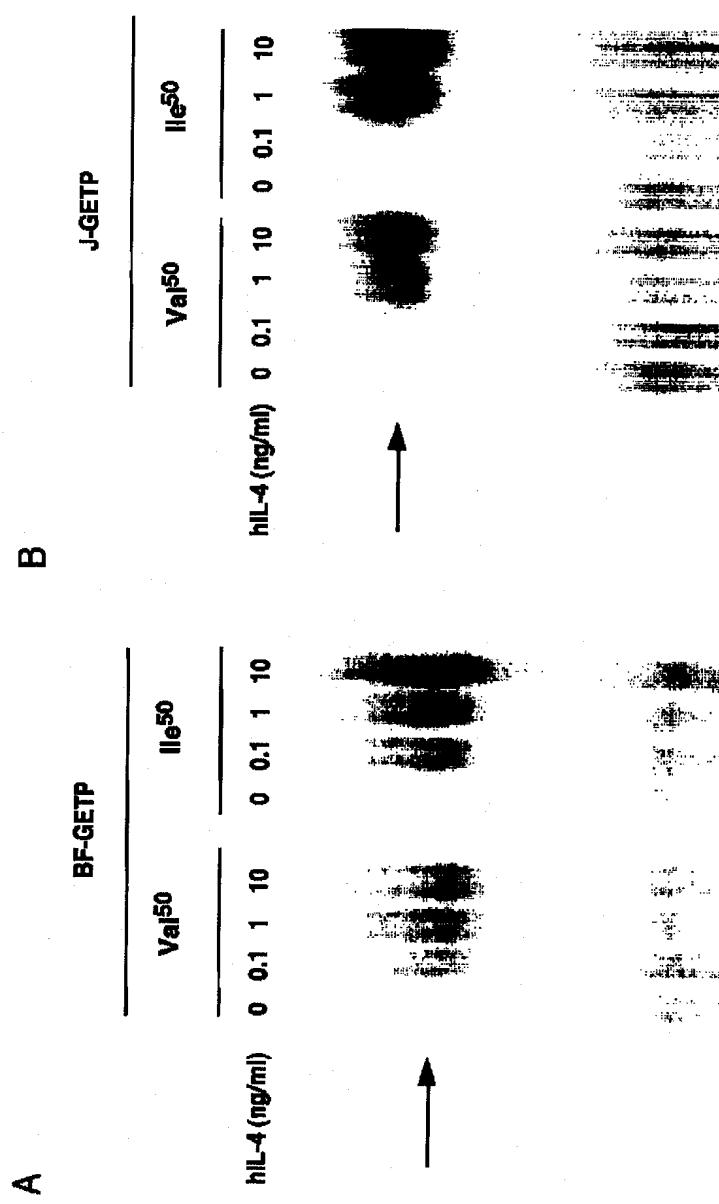
【図4】



【図6】



【図7】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶

G 0 1 N 33/53

識別記号

F I

G 0 1 N 33/53

A 6 1 K 37/02

P